



TITLE:

〔第3篇〕組織の硫酸化処置と
Cyanineme tachromasia 反応の研究
(Cyanine 系色素 Metachromasia
反応の組織化学的研究)

AUTHOR(S):

岡田, 彰

CITATION:

岡田, 彰. 〔第3篇〕組織の硫酸化処置と Cyanineme tachromasia 反応の研究(Cyanine 系色素 Metachromasia 反応の組織化学的研究). 京都大学結核研究所紀要 1964, 12(2): 160-164

ISSUE DATE:

1964-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/51871>

RIGHT:

Cyanine 系色素 Metachromasia 反応の組織化学的研究

〔第3篇〕 組織の硫酸化処置と Cyanine metachromasia 反応の研究

京都大学結核研究所病理学部（主任教授 高松 英雄）

岡 田 彰

（昭39. 2.12受付）

緒 言

本研究 第一、二篇に報じた 如く、Cyanine 系色素の多く のものは酸性 粘液 多糖類 に対し Metachromasia 陽性反応を呈し、就中、NK77, NK193, NK1235 等の 色素は、Metachromasia 染色法に優れた性状をもつ。然し乍ら、既報のごとく、是等の色素は chondroitine 硫酸の稀薄溶液と一様に著明な反応を示すけれども、その反応機構は夫々の色素によって多少異なることを観察した。現在一般に用いられる塩基性色素による metachromasia 反応が硫酸 ester を含む粘液多糖類に最も強く示されることは良く知られる所である。

本来 metachromasia 反応陰性であるところの中性粘液多糖類、糖蛋白体等を硫酸化することによって陽性反応に転換し換し得ることが報告されている。(Kramer, Windrum 1954⁽¹⁾)

是等の諸点から、硫酸基が本反応に密接な関係があることは疑いのないことであるが、此関係についての詳細は尚不明の点が多い。

本篇では、Cyanine 系色素の染色反応について検討し、先づ既知の種々の硫酸基含有物質についての試験管内実験を試み、次に白鼠諸臓器組織に硫酸化の前処置を行って後に本反応を行い、個々の色素による反応を比較検討した。本実験は一方に於て PAS 染色反応との関連性のみならず、特定の硫酸化操作により結合する組織成分の組織化学的検索の開拓をも目標としている。

実験材料及び方法

I. 試験管内実験：被検材料は $(\text{NH})_2 \text{SO}_4$,

CdSO_4 及芳香 Sulfon 族酸 20種類について検討した。NK77 及び NK1235 の0.005%溶液を作成し、各試料毎に4本の試験管を準備して夫々の色素溶液を6cc づつ2本の試験管に注入する。1本に試料の0.01%溶液を数滴滴下し、他の1本を対照として比色する。対称と全く異った色調 (metachromasia の色調) を示す場合を(++)、多少原色の色調を帯びるが明らかな変色を認めるものを(+)、僅に変色を示すものを(±)、変化のないものを(-)と判定した。

II. 硫酸化組織の Cyanine metachromasia 反応

(イ) 組織 第二篇で用いたものと同一の材料を使用した。

(ロ) 硫酸化の方法 Kramer, Windrum の報告に基いて Rickett's (1952⁽²⁾) の方法を用いた。即ち ice-salt 浴中で冷却しつつ、100cc の pyridine の中に chlorosulfon 酸 11cc を滴下混入し、(常温で固体となる) 是を 65°C の恒温器中で溶解せしめ、脱パラ後充分に乾燥せしめた切片をこの中に投入し、65°C で5分間作用せしめた後、充分水洗して染色に移す。

(ハ) 染色、NK77, NK193, NK 1235 の各色素溶液を第二篇に記載した方法で作成し、夫々溜水で2倍に稀釈して用いた。染色時間は室温で10~15分間。硫酸化法を施した組織は一般に塩基性色素を強くって濃染する傾向があるために、染色中に時々切片を観察する必要がある。封入は第二篇に述べた方法と同様にした。

III. PAS 染色法 同一材料について行った。

表 1

(NH ₄) ₂ SO ₄ · CdSO ₄	NK77	NK1235
(NH ₄) ₂ SO ₄ · CdSO ₄	—	—
o-toluol sulfonamid	—	—
p-phenol, p-aminobenzensulfonic acid	—	—
benzol 1,3, disulfonic acid	±	+
dinitrostyryl benzen sulfonic acid	—	+
p-naphthol sulfonicacid (potass, salt)	—	—
1-naphthol-2 sulfonicacid	—	±
2-naphthylamine 1-sulfonic acid	±	+
naphthylamine sulf. acid (Laurents acid, Dahls acid 1.6) (Cleves acid, 1.7 Cleves acid)	—	±
amino-naphthol-sulfonic acid (J-acid, γ acid)	—	±
naphthylamine disulfonic acid (ε-acid, amino G acid, δ acid, Hacid)	+	+
Naphthol disulfonic acid (G. acid, R-acid)	++	++
chromotropic acid	++	++
chondroitine sulfate	++	++

実 験 材 料

I . 試験管内実験

表 I に示す如く, NK 77 と NK 1235 では成績に可成りの差が認められ, 一般に NK1235 が鋭敏に反応した。然し, benzol 誘導体では mono 硫酸塩に 2 例共陰性であり, disulfon 酸では NK 77 が僅に反応陽性であり, NK 1235 で陽性反応を示した。又 naphthylamine の monosulfon 酸は NK 77 で陰性であり, NK 1235 で弱陽性を示し, aminonaphthol sulfon 酸でも同様である。是に対して, disulfon 酸では naphthylamine, naphthol 共に陽性反応を認め, 特に後者に著明な陽性反応が認められた。

II . 組織染色所見

腎：硫酸化した腎の糸球体及び尿細管基底膜は全例に metachromasia の色調を示す。尿細管細胞の内側には NK 193 及び NK 1235 染色によって著明な反応が認められる。(此部分は前篇で行った無処置例の染色で緑色に示された。)硫酸化組織では細胞核は一般に染まらないか, 又は極めて薄い色調に染められた。無処置例で

顕著な metachromasia 反応を示した乳頭部は NK 193, NK 77 で更に強い反応が認められた。

PAS 反応は糸球体, 尿細管基底膜 及び尿細管細胞内側に陽性反応を示し, 乳頭部では弱陽性反応を示す。

胃：胃腺の開口部及び腺管の中央部の細胞形質に NK 77 及び NK 193 で強い陽性を示すが, NK 1235 染色法では組織全体に赤味を帯びて反応は弱い。又粘膜下結合織は NK193 染色法で強陽性, NK 77 及び NK 1235 で陽性反応を認める。NK 1235 固有筋層はでは反応は明確でないが, NK 77, NK 193 染色法で陽性反応を示す。

PAS 反応は胃小窩, 腺腔に強陽性を示し, 腺細胞には弱陽性であった。粘膜下結合織は中等度の陽性, 筋層には反応は認めない。

肝：NK 77 染色法では glisson's capsule 及び肝細胞内小顆粒が陽性反応を示すが, NK193では glisson's capsule の反応は著明ではない。NK 1235 では肝細胞形質が赤味を帯び, glisson's capsule には陰性である。

PAS 反応は肝細胞内に陽性顆粒を認め, glisson's capsule には弱陽性であった。

舌：NK 193, NK 77 染色法で舌腺の粘液腺に強陽性反応を認めるが，NK1235 では不明瞭である。PAS 反応は粘液腺に強陽性，漿液腺に弱陽性反応を認める。

脾：NK77 及び NK193 染色法でラ氏島内に陽性反応を示す細胞が少数認められるが，NK 1235 では反応は認めない。脾細胞は NK77 及び NK193で陽性反応を示し，NK1235 では不鮮明である。

PAS 反応は血管壁，間質組織に陽性であるが，その他には陰性である。

脾：被膜及び脾柱が NK193 染色法で陽性反応を示し，NK 77 及び NK 1235 で弱陽性である。又白髄に NK193 及び NK77 染色法で陽性反応を示す細胞が少数認められる。

PAS 反応は脾柱，脾膜及び血管壁に陽性反応を認める。

考 按

metachromasia 性色素はその溶液の濃度が濃厚になると metachromasia の色調を帯びることが知られている。本実験に用いた cyanine 系色素にもこの現象が認められる。これは色素溶液が濃厚になると色素分子の会合が生じて micelle を形成し，そのために吸収極大が短波長側に示されるようになって，metachromasia 色調を帯びるものと説明されている。²⁾

更に此場合の micelle の大きさは，陰性 colloid を添加した際に生ずるものに比べて遙に小さく，吸収極大が移動する範囲も小さいことが知られている³⁾。一般に micelle の大きさは温度と染料および存在する電解質の濃度に関係し，塩濃度が増すと粒子の大きさが増し，温度が増すと会合が減少する⁴⁾。

著者の試験管内実験の結果 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CdSO_4 では反応は陰性であったが，図 I の如く光電比色計を用いて検討した結果，NK77 の稀薄溶液に此等の濃厚溶液を添加した場合に，NK77 の固有の吸収極大より約 $10\text{m}\mu$ 短波長側に吸収極大を認めた。是は第一篇で示した NK77 の透過率曲線に見られる色素溶液の濃厚な場合の吸収極大の位置と略々一致する。是と同様の所見は Michaelis²⁾, H.L. Booij³⁾ 等によって，夫々 me-

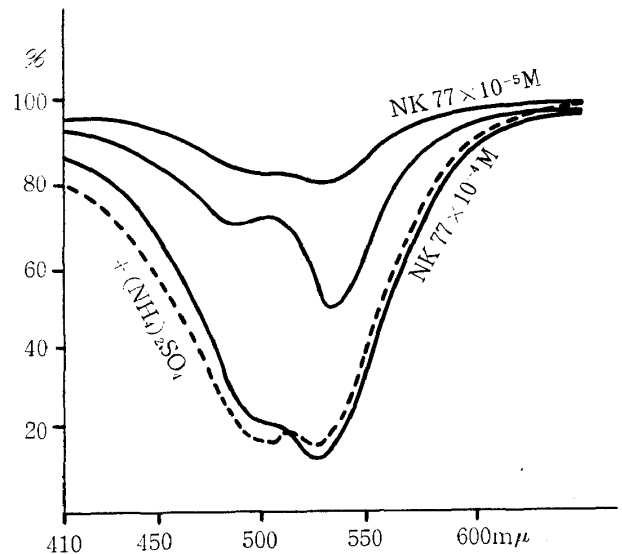


図1 NK77 の透過率曲線

thylene-blue, toluidine blue で観察されている。

芳香族化合物では反応基としての硫酸基を持つものでも陰性反応を示すものがあり，本反応は硫酸基の特異的な化学反応とは考えられない。更に陽性反応を示すものの化学構造についてみると，分子の大きさと硫酸基の数が反応に関係を示し，且 NH_2 基を持つものよりも OH 基を持つものに強い反応が現われる。以上の結果から，色素溶液中の ion micelle が更に大きな colloid 粒子を形成し得るような陰性基を持った比較的大きな分子構造によって示されるのであろうと推定し得る。又本反応に関与する硫酸基は必ずしも ester 結合である必要はないことも明らかである。

NK77 と NK1235 との反応には，その反応性にはかなりの差異があるが，両者の成績はよく比例しており，全く異質のものとは云い難い。

硫酸化組織の染色所見では（表Ⅱ）NK1235 反応は無処置例の染色所見及び試験管内での反応とは全く異って，metachromasia 反応は極めて不明瞭となり且染色性も低下した。是に対して KN193 では第二篇で観察し得た如く，種々の組織要素が多彩な色調に染め分けられ，陽性反応は最も明確に観察し得た。

Kramer 等の報告によると，腎髄質の間質組織は硫酸化を行う前には azur A metachromasia 反応は陰性であって，硫酸化後には著明な

表 II

				硫 酸 化 例			非 硫 酸 化 例			
組 織 染 色 法				NK 77	NK 193	NK 1235	NK 77	NK 193	NK1235	PAS
腎	糸 球 体	尿 細 管	基 底 膜 質 間 質	+	+	++	—	±	—	+
				++	++	+	—	—	—	+
				+	++	+	—	—	—	+
				++	++	+	+	+	+	+
胃	腺 細 胞	胃 小 窩	粘 膜 下 結 合 織 筋 層	++	++	±	±	±	+	±
				++	++	±	—	—	+	++
				+	++	+	±	±	+	+
				+	+	±	—	—	—	—
肝	被 肝	細 胞	膜	+	±	—	—	—	—	±
				+	+	±	—	±	±	+
舌	腺	〃	(粘)	++	++	±	+	+	+	++
			(漿)	—	—	—	—	—	—	±
膵	ラ 膵	氏 細 胞	島 胞	+	+	—	—	—	—	—
				+	++	±	—	—	—	—
脾	脾 膜	脾 柱	髓	±	+	±	—	—	—	+
	白			+	+	—	—	—	—	—

陽性反応が認められ、且 hyaluronidase でこの陽性物質が減少するとされている。然し Cyanine 反応では未処置例で既に著明な反応を認め、硫酸化例ではその陽性反応は増強された。更に Cyanine 反応でも未処置例で反応を示さなかった尿細管及び基底膜等が硫酸化によって陽性反応を示した。

PAS 反応と硫酸化法による metachromasia 反応との間には或程度の相互関係が認められ、PAS 陽性組織は概ね硫酸化後に Cyanine metachromasia を示す。然し乍ら、metachromasia 陽性の chondroitine 硫酸は PAS 反応を示さないことは良く知られており、又膵の zymogen 顆粒の PAS 反応は、動物の種類によって異り、鼠では陰性であるとされていて⁹⁾、著者の成績でも PAS 反応は陰性であった。ところが硫酸化による cyanine metachromasia 反応は陽性に示された。

総 括

NK77 及び NK1235 の色素を用いて各種の硫酸化合物について試験管内で cyanine metachromasia 反応を検討した結果、反応基として硫

酸基を持つものでも陰性反応を示す化合物もあること。又 naphthol disulfon 酸、dioxynaphthalene disulfon 酸等に著明な陽性反応が得られることから、cyanine metachromasia 反応の機構について多少の考察を試みた。

更に NK77, NK193, NK1235 を用いて硫酸化した白鼠の組織について cyanine metachromasia 反応を行い、第二篇で行った白鼠の諸組織の cyanine metachromasia 反応及び PAS 反応と比較検討した結果、NK77 及び NK193 NK193 染色法は共に良好な成績が得られ、特に NK193 染色法はこの目的のためにも優れていることが明らかになった。硫酸化法によって多数の組織要素が metachromasia 陽性反応を示し、その成績は、一部は PAS 反応陽性部位と一致するが、又、興味ある例として白鼠の膵臓の zymogen 顆粒は PAS 反応及び cyanine metachromasia 反応は共に陰性であったが、硫酸化処置によって cyanine metachromasia 陽性反応を示した。

全 篇 の 総 括

著者は cyanine 系色素 112 種類について、

in vitro 及び組織切片における metachromasia 反応を検討した結果, 多数の色素が chondroitine 硫酸又は軟骨基質等の組織に反応を呈することを知り, その中でも NK 77, NK 1235, NK 193 等の色素は組織化学に利用し得ることが明らかとなった。従って, 此等の色素を用いて白鼠の全身諸臓器の組織を材料として本反応の染色法について検討し, NK77, NK193, NK1235 の各染色法を考案した。そしてこの中でも特に NK193 染色法は従来の metachromasia 染色法に比し, 各組織要素が多彩に, 且極めて明瞭に染め分けられて, 陽性反応を示す組織要素の識別が容易であるために, 本反応の染色法として最も優ぐれた方法と云い得る。

亦, metachromasia 反応の組織化学的研究の方法として, 従来組織に酸化⁶⁾, 硫酸化,¹⁾⁷⁾ methyl 化⁸⁾ 等の処理を加えて, その後で反応の消長を検討する方法が行われて来たが, 此等の方法に用いられる色素には夫々或程度の特異性と云う可きものがあるが, 異った色素を用いると成績が多少異なることが知られている。

此故に, 著者の考案した cyanine metachromasia 染色法を此等の方法に用いて検討することは意義のあることであって, 特に硫酸化組織に於ける本反応の関係を検討することは重要である。

先づ試験管内で cyanine metachromasia 反応と硫酸基との関係を各種硫酸化合物について検討し, 次いで Kramer 等の方法に基いて白鼠の諸組織を硫酸化し, cyanine 色素反応を検討した。亦, 同一材料について PAS 反応を併せ行つて, 両者の関係についても比較検討し, 二三の知見を得た。

欄筆するに当り, 終始御指導頂いた高松教授, 御援助頂いた教室員の諸氏に感謝すると共に, 色素を合成, 提供して頂いた日本感光色素研究所の小合博士並びに伴野博士に深甚の謝意を捧げます。

引用文献

- 1) H.Kramer, G.M. Windrum., J. Histochem. Cytochem Vol2, 3, 196-208 (1954).
- 2) Michaelis, L., Cold. Spring. Harb., 12 (1947). (Lison., Histochem et Cytochem; Kelly, act. histochem SI)
- 3) H.L. Booij., act. Histochem suppl. I 37-53 (1958).
- 4) 黒木 宣彦, 解説染色の化学 p33 (1960)
- 5) 市川 収, 細胞化学 p181 (1953).
- 6) Clara., Z. mikr, anat. Forsh., 47 (1940).
- 7) J.W. Kelly, act. histochem, suppl, I 95 (1958).
- 8) Lison Histochem. et Cytochem. (1953).
- 9) J. W. Kelly act. histochem. sppl. I 96(1958).